

The role of coagulation factor XII in fibrin clot formation and fibrinolysis

Citation for published version (APA):

Konings, J. (2014). *The role of coagulation factor XII in fibrin clot formation and fibrinolysis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20140124jk>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

DOI:

[10.26481/dis.20140124jk](https://doi.org/10.26481/dis.20140124jk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Chapter 1 introduces the subject of this thesis. The structure of fibrin clots and their susceptibility to fibrinolysis are important determinants of the thrombotic risk. Clots characterized by a dense fibrin network and resistance to fibrinolysis are associated with an increased risk of thrombosis. The contribution of coagulation factor XII (FXII) to arterial thrombosis is less straightforward. Results from clinical studies are ambiguous, low levels of FXII and high levels of activated FXII (FXIIa) are associated with arterial thrombosis, however not in all clinical studies. FXIIa is able to initiate the intrinsic pathway of coagulation and thereby contributes to thrombin formation. Furthermore, FXIIa can convert plasminogen into plasmin and thereby stimulate fibrinolysis.

The aim of the work described in this thesis, was to determine how FXII influences the fibrin clot structure and the susceptibility to fibrinolysis.

In chapter 2 the influence of FXIIa on fibrin clot formation and structure was determined. In plasma and purified systems, we observed a dose-dependent increase in fibrin fiber density, and a non-linear increase in clot stiffness in the presence of α -FXIIa. In plasma, this increase was dependent on two mechanisms: 1) formation of thrombin via activation of the intrinsic pathway of coagulation, and 2) direct interaction of FXIIa with fibrin(ogen). In binding experiments we showed that purified FXII and α -FXIIa, but not β -FXIIa, bound to purified fibrinogen and fibrin with nanomolar affinity. Furthermore, when we immunoprecipitated FXII from plasma, fibrinogen was present in the precipitate indicating co-precipitation of fibrinogen with FXII. Immunostaining of human carotid artery thrombi showed that FXII(a) co-localized with areas of dense fibrin(ogen) deposition. From these results, we concluded that FXIIa modulates the fibrin structure via activation of the intrinsic pathway of coagulation and via direct interaction with fibrin(ogen).

An increase in density and rigidity of the fibrin clot (as we observed in the presence of α -FXIIa) is characteristic for fibrin clots which are more difficult to lyse. However, α -FXIIa itself can also initiate fibrinolysis by converting plasminogen into plasmin. In chapter 3 we studied the contribution of α -FXIIa to clot stability and fibrinolysis in the presence of low levels of tissue plasminogen activator (tPA). We observed that α -FXIIa directly converted plasminogen into plasmin and reduced clot lysis time in the presence of tPA. This reduction in clot lysis time was caused by an earlier onset of plasmin formation due to the conversion of plasminogen into plasmin by α -FXIIa.

Summary

The main side effect of anticoagulant drugs used in current clinical practice is an increased risk of bleeding. Due to the fact that FXII^{-/-} mice are protected from experimentally induced thrombosis, targeting FXIIa to prevent thrombosis has been considered as a safe alternative. In chapter 4, we tested a monoclonal antibody against FXIIa for its effect on clot formation and fibrinolysis. We observed that the monoclonal antibody increased the clotting time dose-dependently, when coagulation was initiated with a trigger of FXII. Furthermore, the monoclonal antibody reduced the maximal clot firmness and increased the maximal absorbance, indicative of a clot with thicker fibers and a reduced density. The effects on fibrinolysis were minor. In the whole blood ROTEM experiments, the clot lysis time was increased, whereas in turbidity experiments in platelet poor plasma the clot lysis time was decreased in the presence of the monoclonal antibody.

Results from clinical studies investigating the contribution of the contact system to arterial thrombosis are conflicting. In chapter 5 we determined activation of the contact activation system in patients with a first acute myocardial infarction (AMI) during the acute event and 3 and 6 months after the AMI. The degree of contact activation was determined in plasma as the levels of activated factor XI (FXIa), FXIIa and kallikrein in complex with C1 esterase inhibitor (C1INH) and the levels of FXIa in complex with α_1 -antitrypsin (AT). The levels of FXIa-C1INH were elevated during the acute event compared to the steady-phase 3 and 6 months after the AMI. The levels of FXIa-AT, FXIIa-C1INH and kallikrein-C1INH did not change over time. Since the levels of FXIIa-C1INH were not elevated, activation of FXI during the acute phase did probably not result from contact activation. The levels of FXIa-C1INH, FXIa-AT, FXIIa-C1INH and kallikrein-C1INH were not predictive for a recurrent event.

Patients with arterial thrombosis often form fibrin clots with a dense structure, which are less susceptible to fibrinolysis compared to healthy individuals. Coronary stent thrombosis (ST) is a complication of percutaneous coronary intervention (PCI). In chapter 6 we determined if in ST patients the fibrin clot structure and fibrinolysis were altered compared to control PCI patients (patients that received a stent but did not develop ST). Fibrin clot formation and fibrinolysis were assessed by turbidimetric assays. In this study, there was no significant difference in lag time, maximal absorbance or clot lysis time between ST patients and control PCI patients.

Patients with hereditary angioedema due to a deficiency in C1INH (HAE-C1INH) have impaired inhibition of the contact activation system. This leads to

activation of the contact system and release of bradykinin (which mediates the symptoms observed in HAE-C1INH patients). However, these patients do not have an increased risk of thrombosis. We investigated whether activation of the contact system in these patients mainly leads to prekallikrein activation and less to FXI activation. In chapter 7, we measured the activation of the contact system in patients with HAE-C1INH. We did not observe an increase in the levels of enzyme inhibitory complexes between healthy controls, HAE-C1INH patients during remission or HAE-C1INH patients during an acute attack. When we activated the plasma samples with ellagic acid or dextran sulphate to activate FXII, the levels of FXIIa-C1INH, FXIa-C1INH and kallikrein-C1INH were lower in patients compared to healthy controls. Addition of C1INH to plasma of HAE-C1INH patients after activation led to an increase in FXIIa-C1INH and FXIa-C1INH levels. These results indicate consumption of both prekallikrein and FXI, therefore the absence of increased thrombosis in these patients is probably due to the control of the coagulation system by other inhibitors, such as AT, and increased fibrinolysis.

In chapter 9 the main findings of this thesis are discussed. We have found that FXII has a dual role in coagulation and fibrinolysis. During clot formation, activation of FXII leads to a stronger fibrin clot, whereas during fibrinolysis, activation of FXII leads to the formation of plasmin and a faster onset of fibrinolysis. We postulate that during clot formation, FXIIa stabilizes the thrombus by activating the intrinsic pathway of coagulation and by interaction with the fibrin network. This action prevents embolization. During fibrinolysis, FXIIa helps to initiate plasmin formation at low levels of tPA and thereby prevents vessel occlusion.

Furthermore, we discussed the possibility using FXIIa-inhibitors to prevent thrombosis. Although this seems a safe option, clinical trials are needed to determine which patients would benefit from FXIIa inhibition.

Samenvatting

In hoofdstuk 1 wordt het onderwerp van dit proefschrift geïntroduceerd. De structuur van fibrine stolsels en de gevoeligheid van deze stolsels voor fibrinolyse zijn belangrijke determinanten van het trombotisch risico. Stolsels die gekarakteriseerd worden door een hecht fibrine netwerk en een verhoogde resistentie tegen fibrinolyse zijn geassocieerd met een verhoogd risico op trombose. De bijdrage van stollingsfactor XII (FXII) aan arteriële trombose is minder duidelijk. De resultaten van klinische studies zijn tegenstrijdig. Lage concentraties FXII en hoge concentraties geactiveerd FXII (FXIIa) zijn geassocieerd met arteriële trombose, hoewel niet in alle klinische studies. FXIIa is in staat om de intrinsieke stollingscascade te initiëren en draagt zo bij aan trombine vorming. Daarnaast is FXIIa in staat om plasminogeen naar plasmine om te zetten en stimuleert hiermee de fibrinolyse.

Het doel van het werk beschreven in dit proefschrift was te bepalen hoe FXII de structuur van het fibrine stolsel en de gevoeligheid voor fibrinolyse beïnvloedt.

In hoofdstuk 2 is de invloed van FXIIa op de vorming en de structuur van fibrine stolsels bepaald. In aanwezigheid van α -FXIIa, hebben we een dosisafhankelijke toename in de dichtheid van het fibrine netwerk en een niet-lineaire toename in de stijfheid van het stolsel waargenomen. In plasma, droegen twee processen bij aan deze toename: 1) de vorming van trombine via activatie van de intrinsieke stollingscascade, en 2) directe interactie van FXIIa met fibrine en fibrinogeen. In bindingsexperimenten hebben we aangetoond dat gezuiverd FXII en α -FXIIa, maar niet β -FXIIa, binden aan fibrinogeen en fibrine met een hoge affiniteit. Wanneer FXII werd immunogeprecipiteerd uit plasma, was fibrinogeen aanwezig in het precipitaat. Dit wijst erop dat fibrinogeen coprecipiteerde met FXII. Immunokleuring van humane trombi uit de halsslagader toonde co-lokalisatie aan van FXII en gebieden met compacte fibrine deposities. Aan de hand van deze resultaten concludeerden wij dat FXIIa de fibrine structuur beïnvloedt via activatie van de intrinsieke stollingscascade en via directe interactie met fibrinogeen en fibrine.

Een toename in de dichtheid en rigiditeit van fibrine stolsels (zoals we hebben waargenomen in de aanwezigheid van α -FXIIa) is karakteristiek voor fibrine stolsels die moeilijker te lyseren zijn. Echter, α -FXIIa is in staat om de fibrinolyse te initiëren door plasminogeen om te zetten naar plasmine. In hoofdstuk 3 hebben we de bijdrage van α -FXIIa aan de stabiliteit en fibrinolyse van stolsels onderzocht in de aanwezigheid van geringe hoeveelheden weefsel plasminogeen activator (tPA). We hebben waargenomen dat α -FXIIa

plasminogeen naar plasmine kan omzetten en de tijd die nodig is om fibrine stolsels te lyseren (clot lysis time) reduceert in de aanwezigheid van tPA. Deze reductie in clot lysis time werd veroorzaakt door een eerdere vorming van plasmine uit plasminogeen door α -FXIIa.

De huidige antistollingsmiddelen hebben als voornaamste bijwerking dat ze het risico op bloedingen verhogen. Sinds de observatie dat FXII^{-/-} muizen beschermd zijn tegen experimenteel geïnduceerde trombose, wordt het remmen van FXIIa als middel om trombose te voorkomen beschouwd als een veilig alternatief voor de huidige medicatie. In hoofdstuk 4 hebben wij het effect van een monoclonaal antilichaam gericht tegen FXIIa op de vorming en afbraak van stolsels getest. Uit onze experimenten blijkt dat het monoclonaal antilichaam de stollingstijd dosis-afhankelijk verhoogde wanneer stolling geïnitieerd werd met een FXII activator. Daarnaast verlaagde het monoclonaal antilichaam de stevigheid van het stolsel en verhoogde het de maximale absorptie. Dit wijst op een stolsel met dikkere fibrine draden en een lagere dichtheid. De effecten op de fibrinolyse waren klein. De clot lysis time was verlengd in de experimenten uitgevoerd met de volbloed ROTEM, maar verkort in de turbiditeitsexperimenten in plaatjes arm plasma in de aanwezigheid van het antilichaam.

Verschillende klinische studies hebben de bijdrage van het contact systeem aan arteriële trombose onderzocht, echter de resultaten van deze studies zijn niet eenduidig. In hoofdstuk 5 hebben we de mate van activatie van het contact systeem gemeten bij patiënten die een eerste acuut myocard infarct (AMI) doormaakten. De bloedmonsters voor analyse werden afgenomen tijdens het acute infarct en na 3 maanden en 6 maanden. Om de mate van activatie van het contact systeem te bepalen, werden de bloedwaarden van geactiveerd factor XI (FXIa), FXIIa en kallikreïne in complex met C1-esterase inhibitor (C1INH) en de waarden van FXIa in complex met α_1 -antitrypsine (AT) gemeten. De bloedwaarden van FXIa-C1INH waren verhoogd tijdens het acute infarct vergeleken met de waarden 3 en 6 maanden na het infarct. De waarden van FXIa-AT, FXIIa-C1INH en kallikreïne-C1INH veranderden niet in de tijd. Aangezien de waarden van FXIIa-C1INH niet verhoogd waren, werd de activatie van FXI tijdens het acute infarct waarschijnlijk niet veroorzaakt door activatie van het contact systeem. De waarden van FXIa-C1INH, FXIa-AT, FXIIa-C1INH en kallikreïne-C1INH waren niet voorspellend voor het krijgen van een tweede hart- en vaataandoening.

Patiënten met arteriële trombose vormen vaak een fibrine stolsel met een hechte structuur, dat minder gevoelig is voor fibrinolyse dan stolsels van gezonde individuen. Coronaire stent trombose (ST) is een complicatie die kan optreden na een percutane coronaire interventie (PCI). In hoofdstuk 6 hebben we onderzocht of de structuur en afbraak van fibrine stolsels in patiënten met ST afweek van stolsels van controle PCI patiënten (dit waren patiënten bij wie een stent geplaatst was, zonder dat ze ST ontwikkelden). Fibrine vorming en fibrinolyse werden bepaald door middel van turbidimetrische metingen. In deze studie was er geen significant verschil in de tijd tot de vorming van een fibrine stolsel, de maximale absorptie en de clot lysis time tussen ST patiënten en controle PCI patiënten.

De remming van het contact systeem is aangedaan bij patiënten met hereditair angio-oedeem door een deficiëntie in C1INH (HAE-C1INH). Dit leidt tot activatie van het contact systeem en het vrijkomen van bradykinine (wat de symptomen veroorzaakt bij HAE-C1INH patiënten). Echter, deze patiënten hebben geen verhoogd risico op trombose. Wij hebben onderzocht of de activatie van het contact systeem bij HAE-C1INH patiënten met name leidt tot activatie van prekallikreïne en minder tot activatie van FXI. In hoofdstuk 7 hebben we de activatie van het contact systeem gemeten in patiënten met HAE-C1INH en gezonde individuen. Er was geen meetbaar verschil in contact activatie tussen gezonde individuen, HAE-C1INH patiënten tijdens remissie en HAE-C1INH patiënten tijdens een acute aanval van angio-oedeem. Wanneer we echter het plasma behandelden met ellagine zuur of dextraan sulfaat om FXII te activeren, waren de concentraties FXIIa-C1INH, FXIa-C1INH en kallikreïne-C1INH lager in patiënten vergeleken met gezonde individuen. Toevoeging van C1INH aan plasma van patiënten met HAE-C1INH na activatie van dit plasma leidde tot een toename in de waarden van FXIIa-C1INH en FXIa-C1INH. Deze resultaten duiden op verbruik van zowel prekallikreïne als FXI, er was dus geen voorkeur voor de activatie van prekallikreïne. De afwezigheid van een verhoogd risico op trombose bij patiënten met HAE-C1INH is waarschijnlijk het gevolg van een goede regulatie van de bloedstolling door andere natuurlijke stollingsremmers, zoals AT, en een verhoogde fibrinolyse.

In hoofdstuk 9 worden de voornaamste bevindingen van dit proefschrift besproken. We hebben gevonden dat FXII een dubbele rol speelt in bloedstolling en fibrinolyse. Tijdens stolsel vorming, leidt activatie van FXII tot een sterker fibrine stolsel, terwijl tijdens de fibrinolyse, activatie van FXII leidt tot de vorming van plasmine en een snellere start van de fibrinolyse. Wij veronderstellen dat tijdens stolselvorming, FXIIa de trombus stabiliseert door

Samenvatting

activatie van de intrinsieke stollingscascade en door interactie met het fibrine netwerk. Hiermee wordt embolizatie van de trombus voorkomen. Tijdens de fibrinolyse, helpt FXIIa bij de initiatie van plasmine vorming bij lage tPA concentraties en voorkomt hiermee de occlusie van bloedvaten.

Daarnaast hebben we de mogelijkheid besproken om remmers van FXIIa te gebruiken ter preventie van trombose. Hoewel dit een veilige optie lijkt, zijn klinische trials nodig om te bepalen welke patiënten baat hebben bij farmacologische remming van FXIIa.